PATHOLOGISCHES INSTITUT DER CHARITÉ BERLIN

Ueber die Möglichkeiten einer gasanalytischen Methode zur Untersuchung der fermentativen Eiweißspaltung.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Friedrich-Wilhelm-Universität zu Berlin

vorgelegt von
WILHELM ERWIN ENGELHARDT, BERLIN
am 21. Juni 1926.

Buchdruckerei Edmund Mattig,
Dömitz i. Meckl.

133

PATHOLOGISCHES INSTITUT DER CHARITÉ BERLIN

Ueber die Möglichkeiten einer gasanalytischen Methode zur Untersuchung der fermentativen Eiweißspaltung.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Friedrich-Wilhelm-Universität zu Berlin

vorgelegt von
WILHELM ERWIN ENGELHARDT, BERLIN

am ~~21. Juni 1926~~
7. Jan. 1927.

Buchdruckerei Edmund Mattig,
Dömitz i. Mecklenburg

Gedruckt mit Genehmigung
der
medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Geh. Rat Goldscheider
Referent: Prof. Rona
Korreferent: Geh. Rat Kraus

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Ueber die Möglichkeiten einer gasanalytischen Methode zur Untersuchung der fermentativen Eiweißspaltung.

Theoretischer Teil.

Die Anwendung einer gasanalytischen Methode zur Untersuchung fermentativer Spaltungsvorgänge wurde zuerst von Warburg und Minami (1), und zwar zur Beobachtung glykolytischer Vorgänge in der Fermentchemie eingeführt. Eine ähnliche Methode arbeiteten Rona und Lasnitzki (2) für die Fettspaltung aus. Vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Möglichkeiten, eine gasanalytiche Methode für die Eiweißspaltung zu finden.

Den bisher bekannten Methoden:

Formoltitration nach Sörrensen (3)
Titration nach Willstätter (4)
Bestimmung der Aminogruppen nach van Slyke (5)
Aenderung der Leitfähigkeit nach Northrop (6)
Nephelometrische Bestimmungen nach Rona und Kleinmann (7)

wäre die neue Methode an Feinheit, Genauigkeit und Handlichkeit bei weitem überlegen.

Das allgemeine Prinzip der gasanalytischen Methode zur Untersuchung von Fermentwirkungen mit der von Warburg angegebenen Apparatur (1) beruht darauf, daß bei der Spaltung eine Säure frei wird, die stärker dissoziert ist als die Kohlensäure (z. B. Milchsäure bei glykolytischen Vorgängen, Fettsäuren bei der Lipasewirkung) und diese aus einer mit Bikarbonat angereicherten Ringerlösung austreibt. Die Menge der frei gewordenen Kohlensäure wird gemessen und gibt den Grad der Spaltung an.

Als geeignetes Ferment wurde für die Versuche das Erepsin gewählt, welches Peptide in Aminosäuren aufspaltet. Es handelte sich weiter darum, ein geeignetes Substrat zu finden. Dipeptide aus einbasischen Aminosäuren anzuwenden hatte wenig Aussicht auf Er-

folg, da diese sehr schwach dissoziert sind. Trotzdem wurden Versuche mit Glycylglycin und Leucylglycin gemacht, die, aber, wie erwartet, ergebnislos verliefen. Als geeignet mußte ein Dipeptid erscheinen, dessen eine Komponente eine starke Säure ist, wie wir sie in der Asparaginsäure haben.

Tabelle der Dissoziationskonstanten bei 25 Grad.

Asparaginsäure	$1{,}5 \cdot 10^{-4}$	Winkelblech (8)
Glykokoll	$1{,}8 \cdot 10^{-10}$	„
Leucin	$1{,}8 \cdot 10^{-10}$	„
Alanin	$1{,}9 \cdot 10^{-10}$	„
Leucylglycin	$1{,}5 \cdot 10^{-8}$	Euler (9)
Glycylglycin	$1{,}8 \cdot 10^{-8}$	„
Kohlensäure k_1	$3{,}3 \cdot 10^{-7}$	Landoldt-Börnstein (10)
k_2	$6{,}0 \cdot 10^{-11}$	

Es wurde also das Asparagylglycin gewählt und nach der Methode von E. Fischer (11) mit einer kleinen Modifikation dargestellt. Dann wurde seine Spaltbarkeit durch Erepsin nach den Methoden der Willstätter-Titration (4), der Aminogruppenbestimmung nach van Slyke (5) und nach der Warburg-Methode (1) untersucht.

Als Fermente kamen zur Anwendung:

1) Pankreatin „Rhenania". Dies zeigte bei der Prüfung mit Glycylglycin keine ereptische Wirkung.
2) Glycerinextrakt aus Schweinepankreas,
3) „ aus Hundepankreas,
4) „ aus Schweinedarmschleimhaut,
5) „ aus Hundedarmschleimhaut,
6) Bikarbonatschüttelextrakt aus gekeimten Lupinensamen (Nicolai).

2—6 gaben bei der Prüfung mit Glycylglycin, bzw. Leucylglycin gute Spaltung. Bei der Anwendung auf Asparagylglycin ergab sich keine Wirkung.

Die älteren Angaben über die Spaltbarkeit von Dipeptiden durch Pankreasfermente nach Fischer und Abderhalden (12) wurden von Waldschmidt-Leitz mit den heutigen Methoden als nicht zu recht bestehend widerlegt. Er fand zusammen mit Schäffner (13), daß sowohl Pankreas- als Darmerepsin Dipeptide in gleichem Maße spaltet. Doch wurden nur solche

Dipeptide untersucht, die in der Natur vorkommen, wie Glycylglycin, Leucyglycin, Alanylglycin, Glycyltyrosin.

In der Natur nicht auftretende Dipeptide, wie das Asparagylglycin, wurden bisher nicht untersucht. Die Erklärung für seine Resistenz gegen Erepsin der verschiedensten Herkunft mag darin liegen, daß das Erepsin, das doch sicher einen Komplex verschiedener Peptidasen darstellt, sich in einer Art biologischer Anpassung nur auf die ihm in der Natur angebotenen Peptide einstellt.

Als Nebenbefund ergab sich, daß das Optimum der Wasserstoffionenkonzentration für aus gekeimten Lupinensamen hergestelltes Erepsin ebenfalls bei 7,8 liegt, wie es bereits für tierisches (16) und Hefeerepsin (17) festgestellt ist.

Gelegentlich der Untersuchungen im Warburg-Apparat ergab sich bei den Leerwerten der Kontrollen, welche nur Ferment enthielten, eine geringe Kohlensäureentwicklung, die den Gedanken aufkommen ließ, daß die Fermente bei der Spaltung der sie begleitenden Eiweißstoffe geringe Säuremengen freimachen, die dann ihrerseits Kohlensäure aus der Ringerlösung austreiben. Es wurde daher die Wirkung der Fermente auf willkürlich zugesetzte Eiweißstoffe (Casein, Witte-Pepton) im Warburg-Apparat untersucht. Hierbei ergaben sich aber keine irgend nennenswerten Kohlensäuremengen, bei höheren Eiweißkonzentrationen zeigte sich im Gegenteil eine starke Kohlensäureretention, wie sie auch Warburg schon bei Eiweißstoffen gefunden und berechnet hat (15).

Zusammenfassung:

Der ursprüngliche Plan, eine gasanalytische Methode zur Untersuchung der fermentativen Eiweißspaltung zu finden, ließ sich nicht verwirklichen. Die einzelnen Ergebnisse sind folgende:

1) Die Spaltung von Dipeptiden aus einbasischen Aminosäuren läßt sich im Warburg-Apparat nicht verfolgen.

2) Die Spaltung komplexerer Eiweißkörper (Casein, Pepton) läßt sich im Warburg-Apparat ebenfalls nicht verfolgen.

3) Das Asparagylglycin wird von Erepsin aus Schweine- und Hundepankreas, aus Schweine- und Hundedarmschleimhaut, aus gekeimten Lupinensamen, also als in der Natur nicht vorkommendes Dipeptid wohl überhaupt nicht gespalten.

4) Das Optimum der Wasserstoffionenkonzentration des aus Lupinensamen hergestellten Erepsins liegt wie das anderer Erepsine bei 7,8.

Experimenteller Teil:

Darstellung des Asparagylglycins:

28 g Fumarsäure werden mit 100 g Phosphorpentachlorid im Kolben gemischt und im Wasserbad erhitzt. Bei etwa 70° beginnt die Reaktion. In der Vorlage sammelt sich eine wasserhelle Flüssigkeit, im Kolben verbleibt eine leicht gelbliche Flüssigkeit und ein Bodensatz. Nach etwa 30 min ist die Reaktion beendet. Es wird nunmehr im Luftbad höher erhitzt* und das Destillat bis 140° C. (Phosphorchloride) verworfen. Die zwischen 140 und 170° C. übergehende Fraktion wird aufgefangen, bei 120° C. durch Durchleiten von trockener Luft von Phosphoroxychlorid gereinigt. Bei 162° C. destilliert nun das Fumarylchlorid (18) als klare Flüssigkeit über. Ausbeute etwa 10 g.

50 g Glykokollesterchlorhydrat werden mit 25 ccm Wasser übergossen. Es tritt nur teilweise Lösung ein. Dann überschichtet man mit 100 ccm Aether und setzt unter starker Kühlung und Rühren langsam 40 ccm 33%ige Natronlauge zu. Schließlich gibt man noch so viel trocknes gekörntes Kaliumkarbonat zu, daß die wässerige Schicht zu einem dicken Brei wird. Der Aether wird abgegossen und der Brei noch mehrmals mit Aether ausgezogen. Zu den vereinigten ätherischen Lösungen setzt man noch etwas trocknes Kaliumkarbonat und läßt 10 min stehen. Dann filtriert man ab und setzt zu dem Filtrat trocknes Natriumsulfat und läßt es hiermit unter öfterem Umschütteln 4 h stehen. Dann wird abfiltriert und der Aether auf dem Dampfbade verjagt. Der Rückstand, der Glykokollester (19) destilliert bei 1,6 mm Hg bei 32° C. Ausbeute etwa 12 g.

9 g Fumarylchlorid werden in ätherischer Lösung in eine gut gekühlte ätherische Lösung von 12 g Glykokollester eingetragen. Es tritt eine lebhafte Reaktion ein. Die weiße, voluminöse, aber kristalline Masse, welche ausfällt, ist ein Gemisch von Glycinester und Fumaryldiglycinester. Man saugt ab, wäscht 3 mal mit Aether nach und löst die Masse in 750 ccm heißem Wasser. Beim Erkalten fällt der Fumaryldiglycinester (11) in langen farblosen Nadeln aus. Man trocknet über Schwefelsäure im Vakuum. Smp. (k) 211° C.

10 g Fumaryldiglycinester werden mit 60 ccm 10%iger Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur 1 h geschüttelt, dann filtriert. Beim Uebersättigen mit Salzsäure fällt das Fumaryldiglycin aus (20). Man läßt 1 h stehen und filtriert dann bei 0° C. Ueber Schwefel-

säure im Vakuum getrocknet schmilzt der Körper gegen 290° C. unter Zersetzung. Ausbeute etwa 4 g.

4 g Fumaryldiglycin werden mit 28 ccm wässerigem Ammoniak (S. G. 0,91) im zugeschmolzenen Rohr 4 h auf 100° C. erhitzt. Beim Ansäuern darf kein Niederschlag mehr entstehen. Man filtriert und dampft bei stark vermindertem Druck (1,5 mm Hg, 25° C.) zum Sirup ein. Der Sirup wird in Wasser gelöst und mit 6 g Barythydrat ($1^1/_2$ Mol. berechnet auf das ursprüngliche Fumaryldiglycin) versetzt. Man dampft nun unter stark vermindertem Druck zur Trockne ein, löst wieder in Wasser und dampft wieder zur Trockne ein, bis eine Probe der Masse keinen Ammoniakgeruch mehr zeigt. Schließlich löst man den Rückstand nochmals in Wasser und fällt in verdünnter Lösung den Baryt genau mit Schwefelsäure aus. Da aus dem Filtrat nach dem Einengen bei vermindertem Druck das Asparagylmonoglycin (11) sehr schlecht auskristallisiert, wird folgende Modifikation angewendet:

Das Filtrat wird unter vermindertem Druck stark eingeengt und dann mit der vielfachen Menge 98%igem Alkohol das Dipeptid gefällt. Der Alkohol wird abgegossen und die weiche Masse noch 2 mal mit Alkohol durchgeknetet. Beim Trocknen über Schwefelsäure im Vakuum wird die Masse zusehends fester. Die letzten Wasserreste werden der anfangs sehr hygroskopischen Substanz durch Trocknen im Vakuum mit Phosphorpentoxyd bei 78° C. (Alkoholdampfbad), bzw. 100° C. (Wasserdampfbad), wenn man auch das Kristallwasser entfernen will, entzogen. Der Schmelzpunkt wurde bei 144—8° C. (ohne Zersetzung) gefunden.

Identifizierung als Asparagylmonoglycin:

Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl (Mikroanalyse):

1 ccm einer Lösung 0,05 : 5 = 0,01 g.

Vorlage: 5,0 ccm n/50 HCl

0,2 ccm n/50 NaOH zurücktitriert

Verbraucht 4,8 ccm × 0,28 = 1,344 mg N = 13,44%

Berechnet 13,46%

Bestimmung des Aminostickstoffes nach van Slyke (Mikroapparat):

1 ccm einer Lösung 0,05 : 5 = 10 mg entwickelten 1,53 ccm N-Gas. Das entspricht bei den Versuchsbedingungen (20° C., 755 mm) 0,865 mg N = 8,48%

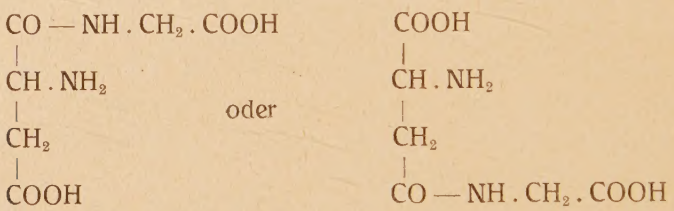
6,73% berechnet.

Van Slyke (5) fand bei Dipeptiden, welche Glycin enthalten, daß auch die NH-Gruppe bis zu 25% mitreagiert. Dies gäbe dann für das Asparagylmonoglycin einen Wert von 8,41% (gef. 8,48%).

Titration der Säuregruppen nach Willstätter (4):

Indikator: Thymolphthalein. Titriert mit n/5 alkoholischer KOH. 50 ccm einer n/1000 Lösung verbrauchten 0,5 ccm n/5 KOH. Dies entspricht zwei Karboxylgruppen.

Durch die Richtigkeit des Schmelzpunktes, des Gesamt-, des Aminostickstoffes, der Karboxylgruppen ist der Körper als Asparagylmonoglycin identifiziert.



Darstellung der Fermentlösungen:

1. Pankreatin „Rhenania".
   0,1 g Pankreatin wurden mit 10 ccm Wasser 15 min bei gewöhnlicher Temperatur extrahiert, filtriert.
2. Erepsin aus Schweinedarm (18):
   Der Dünndarm eines Schweines wird gut gewaschen, dann mit einem Objektträger die Schleimhaut abgeschabt. 80 g Geschabsel werden mit 400 ccm 87%igem Glycerin in einer Reibschale kräftig verrieben. Nach eintägigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur wird durch ein Faltenfilter filtriert. Das klare, gelb gefärbte Filtrat stellt den in den Versuchen meist zur Anwendung kommenden Rohauszug dar. Zur weiteren Reinigung werden 50 ccm des Filtrates mit 150 ccm Wasser versetzt und 5 min bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Weiter werden 10 ccm der überstehenden Flüssigkeit mit 1 ccm n/10 Essigsäure versetzt. Es tritt eine Fällung ein. Nach erneutem Zentrifugieren erhält man eine wasserklare Flüssigkeit.
3. Erepsin aus Schweinepankreas (21):
   85 g mit der Fleischmaschine zerkleinertes Schweinepankreas werden mit 250 g 87%igem Glycerin 4½ h bei 30° C. extrahiert. Filtration durch ein Faltenfilter liefert den Rohauszug.

4. Erepsin aus Hundedarm:
Der Hund wurde durch eine intracardiale Chloroforminjektion getötet, nachdem er 4 h vorher mit 250 g Kalbsmilz gefüttert wurde. 50 g Schleimhautgeschabsel wurden mit 250 ccm 87%igem Glycerin gut verrieben, nach 24 h durch ein Faltenfilter filtiert.
5. Erepsin aus Hundepankreas:
Das Pankreas desselben Hundes wurde in der Fleischmaschine zerkleinert, 8 g des Breies mit 25 ccm 87%igem Glycerin verrieben und nach $4^1/_2$ h Stehen durch ein Faltenfilter filtriert.
Die Rohauszüge von 3—5 wurden nach demselben Verfahren wie 2 gereinigt.
6. Erepsin aus Lupinensamen (22):
500 g Lupinensamen in feuchten Sägespänen 48 h bei 30° C. keimen lassen. Dann werden die Samen abgespült, zwischen Fließpapier getrocknet und in der Buchnerpresse ausgepreßt. Nach 24 h wird von einem entstandenen Niederschlag abzentrifugiert.
2. Methode (nach Nicolai): Die gekeimten Samen werden zermahlen, mit Seesand verrieben, 1 h lang mit einer 2%igen Lösung von Natriumbikarbonat geschüttelt. Der Brei wird ausgepreßt, zentrifugiert und filtriert.

Prüfung der Fermentlösungen:

Zur Prüfung wurden nach den Vorschriften von E. Fischer dargestelltes Glycylglycin (23) und Leucylglycin (24) verwendet.

1. Pankreatin „Rhenania".

Untersuchung durch Titration nach Waldschmidt-Leitz (25). Es wird die Erepsinwirkung der Fermentlösung auf Glycylglycin durch Titration der Karboxylgruppe in 85%igem Methylalkohol verfolgt. Durch Phosphatpuffer wird die für Erepsin optimale Wasserstoffionenkonzentration von 7,8 eingestellt. Das auf 10 ccm aufgefüllte Reaktionsgemisch wird in 130 ccm Methylalkohol eingetragen, 1 ccm 0,5%iges Thymolphtalein als Indikator und 20 ccm Wasser zugesetzt. Es wird mit 0,2 normal 90%iger alkoholischer Kalilauge titriert bis zur schwach blauen Farbreaktion. Daneben werden Leeranalysen gemacht.

1. Versuch.

Leerversuch: 130 ccm Methylalkohol
20 ccm Wasser
1 ccm Thymolphthaleinlösung
verbrauchen 0,9 ccm 0,2 n KOH.

Spaltungsversuch: 0,132 g Glycylglycin
5,0 ccm Phosphatpuffer m/15, ph=7,8
1,35 ccm n/5 NaOH
2 ccm Pankreatinextrakt
1,65 ccm Wasser
10,0

Kontrollen: a) 0,132 g Glycylglycin
5,0 Puffer
1,35 NaOH
3,65 Wasser
10,0

b) ———
5,0 Puffer
1,35 NaOH
2,0 Ferment
1,65 Wasser
10,0

3 h im Thermostat bei 30° C.

Titration:

	Spaltungsv.	Kontr. a	Kontr. b
	9,0	4,9	5,0
Leervers.	0,9	0,9	0,9
	8,1	4,0	4,1

Die Summe der Kontrollen ergibt den Wert des Spaltungsversuches, es ist also keine Spaltung eingetreten.

2. Versuch.

Bestimmung nach van Slyke.

1. 1 ccm Lösung von 0,132 g Glycylglycin in 5 ccm Puffer
   1 ccm Fermentlösung (Extrakt 1 : 10)
2. Kontrollen: a) 1 ccm Lösung
   1 ccm Wasser
   b) 1 ccm Puffer
   1 ccm Ferment

Es wurde an Stickstoff entwickelt:

1.	4,48 ccm entspricht (762 mm, 22° C)	2,53 mg N.
2a.	2,67	1,51
2b.	2,05	1,16
		2,67

Die Summe der Kontrollen entspricht auch hier ziemlich dem Wert des Spaltungsversuches, dieser ist sogar etwas kleiner, doch liegt die Differenz innerhalb der Fehlergrenzen.

3. Versuch.

Um den Leerwert der Fermentlösung zu verringern, wurde noch ein Versuch mit Pankreatinextrakt 0,1 : 10 gemacht. Die Versuchsanordnung war wie bei Versuch 2.

An Stickstoff wurde entwickelt (21° C, 750 mm):

1.	2,76 ccm	= 1,54 mg
2a.	2,48	1,39
2b.	0,25	0,14
		1,53

Also auch hier ergab sich keine Spaltung. Das Pankreatin „Rhenania" enthält demnach kein wirksames Erepsin.

2. Erepsin aus Schweinedarmschleimhaut.

4. Versuch.

Prüfung nach Waldschmidt-Leitz.

1. 0,132 g Glycylglycin
   5,0 ccm Puffer
   1 ccm Fermentlösung (gereinigt)
   1,35 ccm n/5 NaOH
   2,65 ccm Wasser
   10,0

2a. 0,132 g Glycylglycin
   5,0 Puffer
   1,35 NaOH
   3,65 Wasser
   10,0

2b. ———
   5,0 Puffer
   1,35 NaOH
   1,0 Ferment
   2,65 Wasser
   10,0

1 h im Thermostat bei 30° C.

Titration:

	1.	2a.	2b.
	5,50	5,15	1,35
Leerwert	0,9	0,9	0,9
	4,60	4,25	0,45

Die Summe der Leerwerte 4,70 entspricht dem Wert des Spaltungsversuches 4,6. Es ist also keine Spaltung nachzuweisen.

5. Versuch.

Ohne Zusatz von Natronlauge, doppelte Fermentmenge, längere Dauer.

1. 0,132 g Glycylglycin
5,0 Puffer
2,0 Ferment
3,0 Wasser
10,0

2a. 0,132 g Glycylglycin
5,0 Puffer
5,0 Wasser

2b. ———
5,0 Puffer
2,0 Ferment
3,0 Wasser
10,0

4 h bei 30° C. im Thermostat.

Wasserstoffionenkonzentration mit Gaskette gemessen: ph = 7,45.

Titration:

	1.	2a.	2b.
	6,2	5,2	1,2
Leerwert	0,9	0,9	0,9
	5,3	4,3	0,3

Die Summe der Leerwerte 4,6 ist kleiner als der Wert des Spaltungsversuches 5,3. Diff. 0,7 entspricht einer Spaltung von 16,3%.

6. Versuch.

Gleiche Versuchsanordnung wie im 5. Versuch. Verwendung von 1,3 m-Phosphatpuffer statt des 1 15 m. Verwendung des noch nicht mit Essigsäure gefällten Auszuges. 2½ h bei 30° C. Gem.: ph = 7,38.

Titration:

	1.	2a.	2b.
	6,8	5,6	1,35
Leerwert	0,9	0,9	0,9
	5,9	4,7	0,45

Die Summe der Leerwerte 5,15 ist kleiner als der Wert des Spaltungsversuches. Die Differenz 0,75 entspricht einer Spaltung von 15,9%.

3. Erepsin aus Hundepankreas.

7. Versuch.

Verwendung von Rohextrakt, 1 3 m-Phosphatpuffer von ph = 7,8.

1. 0,132 g Glycylglycin
5,0 ccm Puffer
0,25 ccm Extrakt
4,75 ccm Wasser
10,0

2a.		2b.	
	0,132 g Glycylglycin		5,0 Puffer
	5,0 Puffer		0,25 Extrakt
	5,0 Wasser		4,75 Wasser
	10,0		10,0

2 h bei 30° C.

Titration:

	1.	2a.	2b.
	5,9	5,5	1,0
L. W.	0,9	0,9	0,9
	5,0	4,6	0,1

Summe der Kontrollen: 4,7
Differenz: 0,3
Entspricht einer Spaltung von 6,6%.

4. Erepsin aus Hundedarmschleimhaut.

8. Versuch.

Gleiche Versuchsanordnung. Verwendung von 1,0 ccm Schleimhautextrakt vom Hundedarm.

Titration:

1.	2a.	2b.
5,7	5,5	0,98
0,9	0,9	0,9
4,8	4,6	0,08

Summe der Kontrollen: 4,68
Differenz: 0,12
Entspricht einer kaum nennenswerten Spaltung.

9. Versuch.

Gleiche Versuchsverordnung. Verwendung von 1,0 ccm mit Essigsäure gereinigten Extraktes.

Titration:

1.	2a.	2b.
5,5	5,5	0,9
0,9	0,9	0,9
4,6	4,6	0,0

Keine Spaltung.

Prüfung der Fermentlösungen nach van Slyke:

10. Versuch.

Prüfung folgender Fermentlösungen mit Leucylglycin:

1. Hundepankreasextrakt.

2. Rohauszug aus Hundedarmschleimhaut.
3. Rohextrakt aus Schweinedarmschleimhaut.

Es werden die Rohextrakte verwendet, da die gereinigten sehr schlechte Spaltungen ergaben.

Lösung von 0,188 g Leucylglycin in 5,0 m/3 Phosphatpuffer ph = 7,8.

1. 1,0 Lösung
   0,25 Extrakt
   0,75 Wasser
   Kontrollen: a) 1,0 Lösung, 1,0 Wasser; b) 1,0 Puffer, 0,25 Extrakt, 0,75 Wasser
2. 1,0 Lösung
   1,0 Ferment
   b) 1,0 Puffer, 1,0 Ferment
3. 1,0 Lösung
   1,0 Ferment
   b) 1,0 Puffer, 1,0 Ferment

Im Thermostat bei 30° C. $2^1/_2$ h.

Je 1 ccm 5 min im Mikro-Apparat nach van Slyke geschüttelt. Das frei gewordene Gas 1 min in der Hempelschen Bürette geschüttelt.

Versuchsbedingungen: 20° C., 756 mm. Umrechnungsfaktor für ccm Stickstoff in mg Stickstoff: 0,566.

1 ccm enthält je 18,8 mg Substrat. Ber. N-Gehalt 7,45%.

Tabelle I.

Nr.	ccm N	minus Leerwert	mg N	% N	Differenz geg. ber.	% Spaltung
1	3,78	3,48	1,97	10,47	2,10	28,2
1a	2,78	2,78	1,57	8,37	0,92	13,6
1b	0,30					
2	3,23	2,90	1,64	8,73	0,36	4,8
2b	0,33					
3	3,71	3,58	2,03	10,78	2,31	31,0
3b	0,13					

Der zu hohe Wert bei der Substratkontrolle beruht wieder darauf, daß bei Glycinkörpern die NH-Gruppe zum Teil mitreagiert.

Die Auszüge aus Pankreas und Schweinedarmschleimhaut spalten demnach ziemlich gut, der aus Hundedarmschleimhaut minimal.

11. Versuch.

Verfolgung der Kinetik.

0,132 g Glycylglycin in 5 ccm m/15 Phosphatpuffer ph = 7,8 gelöst. Dazu 5,0 ccm Glycerinextrakt aus Schweinedarmschleimhaut (mit Wasser geklärt). Im Thermostat bei 30° C.

Bestimmung nach van Slyke: Je 1 ccm = 13,2 mg.
Versuchsbedingungen: 20° C., 755 mm, Faktor = 0,5652.
Leerwert der Kontrolle 0,25 ccm N. (L. W.) Nach 24 h: 0,58.

Tabelle II.

Zeit in Min.	ccm N	min. LW.	mg N	% N	Diff.	% Spalt.
0	2,53	2,28	1,29	9,76		
30	2,98	2,73	1,54	11,66	1,06	10,0
90	3,23	2,98	1,68	12,73	2,13	20,0
210	3,43	3,18	1,80	13,64	3,04	28,7
270	3,56	3,31	1,87	14,17	3,57	33,7
24 h	3,98	3,40	1,91	14,47	3,87	36,5

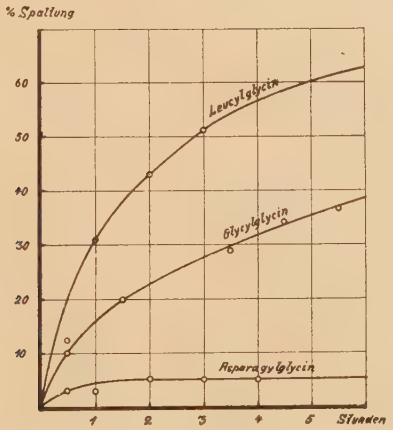


Abb. 1. Zu Versuch 11, 12, 16 und 17.

12. Versuch.

0,188 g Leucylglycin in 5 ccm m/15 Phosphatpuffer ph = 7,8 gelöst und 5,0 ccm Fermentlösung zugesetzt.

Im Thermostat bei 30° C. Je 1 ccm = 18,8 mg.
Versuchsbedingungen: 20° C., 755 mm. Faktor: 0,5652.
Leerwert: 0,25 ccm N. Nach 24 h: 0,58.

Tabelle III.

Zeit in Min.	ccm N	min. – L. W.	mg N	% N	Diff.	% Spalt.
030	3,03	2,78	1,57	8,36	0,91	12,20
60	3,48	3,23	1,83	9,73	2,28	30,60
120	3,78	3,53	2,00	10,64	3,19	42,82
180	3,98	3,73	2,11	11,22	3,77	50,60
24	4,11	3,86	2,18	11,59	4,14	55,56
24 h	4,68	4,10	2,31	12,29	4,84	64,97

13. Versuch.

Prüfung von frischem Rohauszug aus Schweinepankreas, Schweinedarmschleimhaut und Preßsaft aus gekeimten Lupinen.

0,132 g Glycylglycin in 5,0 ccm Phosphatpuffer ph – 7,8 gelöst.

a) 1,0 ccm Lösung
0,5 ccm Ferment
0,5 ccm Wasser

b) 1,0 Puffer
0,5 Ferment
0,5 Wasser

1 ccm = 13,2 mg Substrat. Ber. 10,6% N.

Im Thermostat bei 30° C.

Versuchsbedingungen: 20° C., 756 mm. Faktor: 0,566.

Tabelle IV.

Bez.	Zeit	ccm N	– L. W.	mg N	% N	Diff.	% Sp.
Substrat	0	2,42	2,42	1,37	10,4	—0,2	—
Pankr. a)	6h	3,37	2,54	1,44	10,9	0,3	3,0
b)	6h	0,83					
Darm a)	4½ h	4,65	4,17	2,36	17,9	7,3	68,8
b)	4½ h	0,48					
Lup. a)	4h	3,30	2,42	1,37	10,4	—0,2	—
b)	4h	0,88					

Pankreas spaltet minimal, die Darmschleimhaut wieder sehr gut, der rohe Preßsaft aus Lupinen gar nicht.

14. Versuch.

Prüfung des Bikarbonatschüttelextraktes aus gekeimten Lupinensamen und Feststellung des Optimums der Wasserstoffionenkonzentration.

0,263 g Leucylglycin in 7 ccm Wasser gelöst. Davon je 1,0 ccm, dazu 1,0 ccm Fermentlösung, 1,0 ccm Pufferlösung. Dann enthält 1,0 ccm 12,5 mg Substrat. ber. 7,45 % N.

1a) 1,0 Lösung
1,0 Ferment gem. ph = 4,97
1,0 Wasser

b) 1,0 Ferment
2,0 Wasser

2a) 1,0 Lösung
1,0 Ferment
1,0 Puffer ph = 6

b) 1,0 Ferment
1,0 Wasser
1,0 Puffer ph = 6

3a) 1,0 Lösung
1,0 Ferment
1,0 Puffer ph = 7,8

b) 1,0 Ferment
1,0 Wasser
1,0 Puffer ph = 7,8

0. 1,0 Lösung
1,0 Wasser
1,0 Puffer

4a) 1,0 Lösung
1,0 Ferment
1,0 Puffer ph = 9,0

4b) 1,0 Ferment
1,0 Wasser
1,0 Puffer ph = 9

4 h bei 37,5° C. im Thermostat.

Versuchsbedingungen: 21° C., 756 mm. Faktor: 0,5635.

Tabelle V.

Bez.	ccm N	—L.W.	mg N	% N	Diff.	% Sp.	ph
0	1,63	1,63	0,92	7,36			
1a)	3,05	1,73	0,97	7,76	0,31	4,2	4,97
b)	1,32						
2a)	2,95	1,78	1,00	8,0	0,55	7,4	6,0
b)	1,17						
3a)	3,20	2,03	1,14	9,12	1,67	22,4	7,8
b)	1,17						
4a)	2,62	1,79	1,02	8,15	0,60	8,0	9,0
b)	0,83						

Das Optimum der Wasserstoffionenkonzentration für das mit Bikarbonatextraktion aus gekeimten Lupinensamen hergestellte Erepsin liegt demnach bei ph = 7,8.

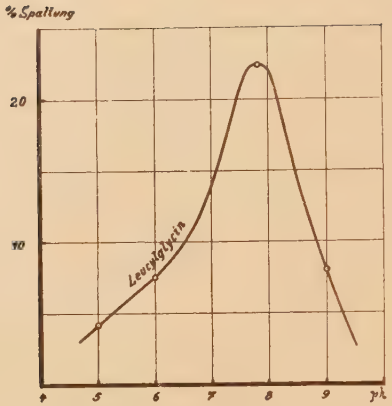


Abb. 2. Versuch 14.

Spaltungsversuche mit Asparagylglycin.

15. Versuch.

0,095 g Asparagylglycin in 5 ccm m/15 Phosphatpuffer ph = 7,8 gelöst.

Substrat: 1 ccm Lösung und 1 ccm Wasser.

1a) 1,0 Lösung
1,0 Pankreasextrakt (Hund)

b) 1 ccm Puffer
1 ccm Extrakt

2a) 1,0 Lösung
1,0 Schleimhautextrakt (Schwein)

b) 1 ccm Puffer
1 ccm Extrakt

Im Thermostat bei 30° C. $3^1/_2$ h.

Versuchsbedingungen: 21° C., 755 mm. Faktor: 0,5628.

Je 1 ccm = 9,5 mg.

Tabelle VI.

Bez.	ccm N	— L.W.
Substr.	1,35	1,35
1a)	1,74	1,26
b)	0,48	
2a)	1,63	1,28
b)	0,35	

Die Werte erreichen noch nicht einmal den Leerwert des Substrates. Allerdings ist der Versuch nicht maßgebend, da Trübungen auftraten und der Puffer bei dem stark sauren Substrat wohl nicht ausgereicht hat.

16. Versuch.

Die Lösung wird mit n/10 Natronlauge gegen Lakmus neutralisiert.

0,095 g Asparagylglycin in 5 ccm Wasser gelöst. Dazu
5 ccm n/10 NaOH
5 ccm m/3 Phosphatpuffer ph=7,8
5 ccm Ferment (Schweinedarm)
20 ph = 7,45 gem.

Kontrolle: 5 ccm Ferment
5 ccm Puffer
10 ccm Wasser
20 Machte 0,27 ccm N frei.

Bestimmung nach van Slyke, je 2 ccm = 9,5 mg.
Bedingungen: 20° C., 755 mm. Faktor = 0,5625.
Im Thermostat bei 30° C.

Tabelle VII.

Zeit	ccm N	— L. W.	mg N	% N	Diff.	% Sp.
0	1,51	1,24	0,70	7,36		
30	1,53	1,26	0,71	7,45	0,09	0,34
60	1,53	1,26	0,71	7,45	—	0,34
120	1,58	1,31	0,74	7,79	0,34	6,44
180	1,58	1,31	0,74	7,79	—	6,44

Dies sind so minimale und unregelmäßige Werte, daß man ihnen keine Bedeutung zulegen kann.

17. Versuch.

Wiederholung in stärkerer Konzentration.

0,095 g Asparagylglycin in 5 ccm n/10 NaOH gelöst. 5 ccm Schleimhautextrakt mit 15 ccm m/15 Phosphatpuffer ph = 7,8 versetzt und zentrifugiert. Hiervon 5 ccm zu 5 ccm Lösung zugesetzt. Gem. ph. = 7,29.

Kontrolle: Nur Fermentpufferlösung. Ergab 0,38 ccm N.

Im Thermostat bei 37° C.

Bestimmung nach van Slyke je 2 ccm = 10 mg.

Bedingungen: 20° C., 755 mm. Faktor: 0,5652.

Tabelle VIII.

Zeit	ccm N	— L.W.	mg N	% N	Diff.	% Sp.
0	2,76	2,38	1,34	7,05	0	0
60	2,76	2,38	1,34	7,05	0	0
180	2,88	2,50	1,41	7,42	0,37	5,5
240	2,88	2,50	1,41	7,42	0	5,5

Das Ergebnis ist dasselbe. Untersuchung nach 24 h gab stets Abfall der Werte und Ausflockung.

18. Versuch.

0,0416 g Asparagylglycin in 2 ccm NaOH gelöst
0,5 ccm Pankreasextrakt
1,5 Puffer ph = 7,8
4,0

Kontrolle: 0,5 Extrakt
1,5 Puffer
2,0 Wasser
4,0

Im Thermostat bei 38° C.

Bestimmung nach van Slyke je 1 ccm 10,4 mg. 20° C., 755 mm. Faktor: 0,5652.

Tabelle IX.

Bez.	Zeit	ccm N	—L.W.	mg N	% N	Diff.	% Sp.
Substr.	0	1,64	1,31	0,74	7,11		
Kontr.	0	0.53					
Substr.	3½h	1,91	1,33	0,75	7,21	0,1	1,4
Kontr.	3½h	0,58					

Auch dieser Versuch ergab so gut wie keine Spaltung.

19. Versuch.

Stärkere und größere Puffermengen. Neue Fermente.

1. Bikarbonatlupinenschüttelextrakt. Mit n 10 NaOH neutralisiert.
2. Lupinenglycerinauszug: 120 g gemahlene Lupinensamen (nach 48 h Keimung) 24 h mit 250 ccm 87%igem Glycerin extrahiert, filtriert.

3. Frischer, geprüfter Glycerinextrakt aus Schweinedarmschleimhaut.
0,07 g Asparagylglycin in 4 ccm n 10 NaOH gelöst. Dazu
3 ccm m/3 Phosphatpuffer ph = 7,8
7 ccm. 1 ccm = 7 mg.

0) 1 ccm Lösung
0,5 Puffer
0,5 Wasser

a) Je 1 ccm Lösung
0,5 Puffer
0,5 Ferment

b) Je 1 ccm Wasser
0,5 Puffer
0,5 Ferment

Bei 38° C. 5 h im Thermostat.
Bestimmung nach van Slyke: 20° C., 756 mm. Faktor: 0,5660.

Tabelle X.

Bez.	ccm N	—L. W.	mg N
0	0,63	0,63	0,36
1a)	1,09		
b)	0,55	0,59	0,34
2a)	0,88		
b)	0,42	0,46	0,26
3a)	0,71		
b)	0,29	0,42	0,24

Die Werte bleiben sogar hinter dem Wert der Substratkontrolle zurück. Von Spaltung ist also keine Rede.

Das Asparagylglycin wird demnach von Erepsin der verschiedensten Herkunft nicht gespalten.

Versuche mit der Warburg-Apparatur.

Die angewandte Methode entspricht im wesentlichen der von Warburg (1) beschriebenen. Als Gefäße dienten eine Art kleiner Doppelkölbchen, wie sie von Nicolai (26) angegeben sind: ein größeres Gefäßchen steht mit dem Barcroftmanometer in Verbindung, ein kleineres wird durch einen eingeschliffenen Glasstöpsel verschlossen; zwischen beiden ist ein Verbindungsstück. Man kann auf diese Weise Substrat- und Fermentlösung bis zum Beginn des Versuches getrennt halten und dann durch einfaches Umschütteln leicht vereinigen.

Als Ringerlösung wurde eine Lösung folgender Zusammensetzung benutzt:

100 ccm 0,9 %ige NaCl-Lösung
30 ccm 1,26%ige $NaHCO_3$-Lösung
2 ccm 1,76%ige $CaCl_2$-Lösung
2 ccm 1,2 %ige KCl-Lösung.

Als Kontrollgefäße dienten ein Thermobarometer, welches nur die gleiche Flüssigkeitsmenge enthielt, ein Gefäß, in dessen Beschickung die Substratlösung fortblieb und ein Gefäß, in welchem die Fermentlösung fortblieb.

Nachdem die Gefäße gefüllt und mit den Barcroftmanometern verbunden sind, wird 2 min lang ein Gemisch von 5 Vol.-Proz. Kohlensäure und 95 Vol.-Proz. Stickstoff, bzw. bei manchen Versuchen Sauerstoff durchgeleitet. Während des Versuches tauchen die Gefäße in einen auf 37,5° C. eingestellten Wasserthermostaten. Durch eine mit einem Motor betriebene Schüttelvorrichtung werden die Manometer gleichmäßig hin- und herbewegt. Vor der Vereinigung der beiden Lösungen und damit dem Beginn des Versuches wird zwecks Temperaturausgleichs 10 min geschüttelt.

Die durch Säurebildung aus der Ringerlösung ausgetriebene Kohlensäure wird in Millimetern Brodiescher Flüssigkeit gemessen. Daraus ergibt sich die CO_2-Menge in Kubikmillimetern (bei 0° C. 760 mm) durch Multiplikation mit der Gefäßkonstanten für Kohlensäure:

$$K_{CO\,2} = \frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F \cdot \alpha}{10\,000}$$

Hierin ist V_G das Volumen des Gasraumes bis zur Nullmarke, V_F das Volumen der eingefüllten Flüssigkeitsmenge, hier meist 1,5 ccm, beide in Kubikmillimetern, T die absolute Temperatur, α der Absorptionskoeffizient für Kohlensäure bei T° C. $V_G + V_F$ stellen das Gesamtvolumen V dar, das bei der Eichung der Gefäße bestimmt wird (1).

Die Gefäßkonstante der benutzten Gefäße I–V war für V_F = 1,5 ccm:

I. 0,595
II. 0,645
III. 0,609
IV. 0,616
V. 0,629.

In den Versuchstabellen stehen in der 1. Spalte die abgelesenen Brodiewerte, in der 2. die Differenzen gegen den vorhergehenden Wert, in der 3. nach Abzug der Thermobarometerkorrektur.

20. Versuch.

Bestimmung der CO_2-Abspaltung durch Aminosäuren.

Zur Anwendung kommen 2%ige Lösungen von Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure und eine Mischung von gleichen Teilen der Glykokoll- und der Asparaginsäurelösung.

Tabelle XI.

Zeit	I.		II.			III.			IV.			V.		
	Therm. Bar.		1,0 Ringer 0,5 Glykokoll			1,0 Ringer 0,5 Alanin			1,0 Ringer 0,5 Asparag.			1,0 Ringer 0,5 Misch.		
0	8,0		4,6			5,8			2,0			1,3		
5′	8,1	0,1	7,3	2,7	2,6	8,4	2,6	2,5	48,0	46,0	45,9	27,8	26,5	26,4
10	8,1	—	7,8	0,5	0,5	8,9	0,5	0,5	58,9	10,9	10,9	37,3	9,5	9,5
15	8,2	0,1	8,2	0,4	0,3	9,4	0,5	0,4	67,1	8,2	8,1	41,8	4,5	4,4
Umgerechnet in Kubikmillimeter und dann summiert:														
5′			16,8	16,8		15,2	15,2		282,7	282,7		166,1	166,1	
10			3,2	20,0		3,0	18,2		67,1	349,8		59,8	225,9	
15			1,9	21,9		2,4	20,6		49,9	399,7		27,7	253,6	

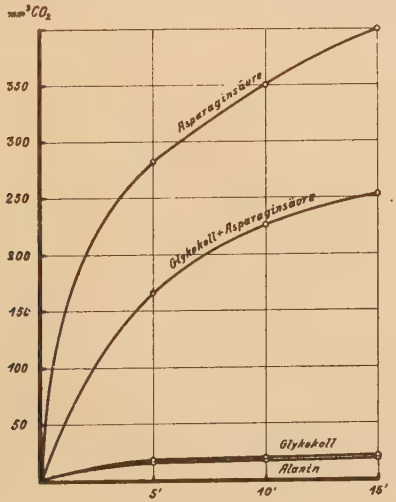


Abb. 3. Versuch.

Die einbasischen Aminosäurenn treiben also wie erwartet sehr geringe Mengen CO_2 aus, die zweibasische Asparaginsäure dagegen sehr erhebliche. Dies ist ein Beweis, daß das Asparagylglycin, falls es gespalten würde, für die Methode sehr geeignet wäre.

21. Versuch.

Bestimmung der CO_2-Abspaltung durch Dipeptide.

Es kommen 1%ige Lösungen von Glycylglycin und Leucylglycin zur Anwendung.

Tabelle XII.

Zeit	Ther. Bar.	IV.			V.		
		1,0 Ringer 0,5 Gl. Gl.			1,0 Ringer 0,5 Leuc. gl.		
0	—	9,3			11,6		
5′	—	21,0	11,7	11,7	20,1	8,5	8,5
10	0,1	21,4	0,4	0,3	20,7	0,6	0,5
15	—	21,6	0,2	0,2	21.1	0,4	0,4
20	—	22,1	0,5	0,5	21,1	—	—
25	0,1	22,5	0,4	0,3	21,3	0,2	0,1
30	—	22,5	—	—	21,3	—	—
1h	0,1	22,8	0,3	0,2	21,7	0,4	0,3
2	0,2	23,4	0,6	0,4	21,9	0,2	—
3	0,2	24,0	0,6	0,4	22,4	0,5	0,3
4	0,2	24,2	0,2	—	22,6	0,2	—
Umgerechnet und summiert:							
5′		67,1	67,1		53,5	53,5	
10		1,8	68,9		3,1	56,6	
15		1,2	70,1		2,5	59,1	
20		3,1	73,2		—	59,1	
25		1,8	75,0		0,6	59,7	
30		—	75,0		—	59,7	
1h		1,2	76,2		1,9	61,6	
2		2,5	78,7		—	61,6	
3		2,5	81,2		1,9	63,5	
4		—	81,2		—	63,5	

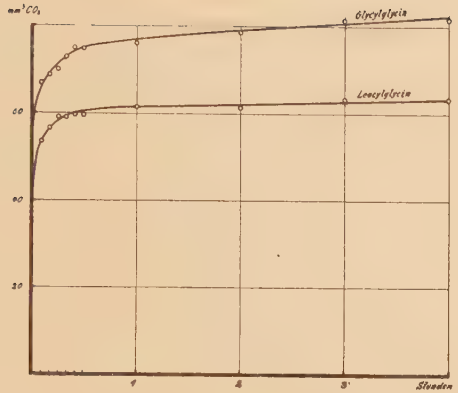


Abb. 4. Versuch 21.

Spaltungsversuche im Warburg-Apparat.

Bei den folgenden Versuchstabellen steht der Einfachheit halber in der 1. Spalte gleich die Druckdifferenz in ccm Brodie gegen die vorherige Ablesung nach Abzug der Thermobarometerkorrektur, in der 2. Spalte nach Umrechnung in Kubikmillimeter CO_2, in der 3. Spalte nach Summierung.

22. Versuch.

Spaltung von 3%iger Glycylglycinlösung durch Glycerinextrakt aus Darmschleimhaut des Schweines.

Tabelle XIII.

Gef.	II.			III.			IV.	Kontrollen		V.		
Zeit	0,5 Ringer 0,5 Gl. Gl. 0,5 Ferment			0,5 Ringer 0,5 Gl. Gl. 0,5 Ferment			0,5 Ringer 0,5 Wasser 0,5 Ferment			0,5 Ringer 0,5 Gl. Gl. 0,5 Wasser		
5′	22,8	147,0	147	23,1	141	141	-0,2	-1	-1	16,3	103	103
10	4,9	32,0	179	5,3	32	173	+0,2	+1	0	7,2	46	149
15	1,4	9,0	188	1,4	9	182	0,2	1	+1	3,0	19	168
25	0,3	2,0	190	0,7	4	186	0,1	1	2	1,9	12	180
35	—	—	190	-0,1	-1	185				0,4	3	183
45	-0,1	-1,0	189	-0,3	-2	183				0,2	1	184
60	-0,2	-1,0	188	-0,3	-2	181				0,2	1	185

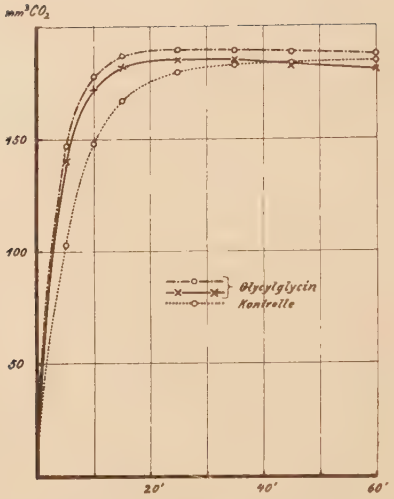


Abb. 5. Versuch 22.

Die Werte der Spaltungsversuche laufen mit der Kontrolle etwa parallel, der Endwert ist fast gleich. Es läßt sich hiermit keine Spaltung nachweisen. Dies liegt, wie zu erwarten, teils an der geringen Dissoziation der einbasischen Aminosäuren, teils an Kohlensäureretention durch Dipeptidlösungen, wie aus dem Abfall der Werte am Ende ersichtlich.

23. Versuch.

Spaltung von 2%iger Leucylglycinlösung durch Glycerinextrakt aus Darmschleimhaut des Schweines.

Tabelle XIV.

Die Ablesungen werden erst nach $^1/_2$ h begonnen, um die Resorption und Säureaustreibung durch das Substrat zur Ruhe kommen zu lassen.

Zeit	II.			III.			VI.			V.		
	0,5 Substrat 0,5 Ferment 0,5 Ringer			0,5 Substrat 0,5 Ferment 0,5 Ringer			0,5 Substrat 0,5 Glycerin 0,5 Ringer			0,5 Ringer 0,5 Ferment 0,5 Ringer		
$^1/_2$h	0,2	1	1	0,1	1	1	0,2	1	1	0,2	1	1
1	—	0	1	—	0	1	0,1	1	2	—	0	1
1 $^1/_2$	0,2	1	2	0,1	1	2	0,4	2	4	0,4	3	4
2	0,2	1	3	0,2	1	3	0,4	2	6	0,2	1	5
2 $^1/_2$	0,4	3	6	0,2	1	4	0,7	4	10	0,5	3	8
3	0,6	4	10	0,4	2	6	0,9	6	16	0,6	4	12
4	—		10	0,2	1	7	0,3	2	18	0,4	3	15

Die Kontrollwerte übersteigen sogar die Versuchswerte.

24. Versuch.

0,02 g Asparagylglycin zur Neutralisation in 2,0 ccm 1,26-% iger Natriumkarbonatlösung gelöst. Schweinedarmhautextrakt. extrakt.

Tabelle XV.

Zeit	II.			III.			IV.			V.		
	0,5 Substrat 0,5 Ferment 0,5 Ringer			0,5 Substrat 0,5 Ferment 0,5 Ringer			0,5 Substrat 0,5 Glycerin 0,5 Ringer			0,5 Ringer 0,5 Ferment 0,5 Ringer		
10	0,2	1,3	1,3	0,1	0,6	0,6	0,1	0,6	0,6	—	—	—
15	0,2	1,3	2,6	—	—	0,6	—	—	1,2	—	—	—
20	0,3	1,9	4,5	—	—	0,6	—	—	6,1	—	—	—
30	—	—	4,5	—	—	0,6	0,1	0,6	12,9	—	—	—
1h	0,3	1,9	6,4	0,3	1,8	2,4	0,8	4,9	19,1	0,6	3,8	3,8
2	0,5	3,2	9,6	0,4	2,4	4,8	1,1	6,8	24,0	0,3	1,9	5,7
3	1,1	7,1	16,7	0,8	4,9	9,7	1,0	6,2	24,0	0,5	3,1	8,8
4	0,6	3,9	20,6	0,4	2,4	12,1	0,8	4,9	24,0	0,5	3,1	11,9

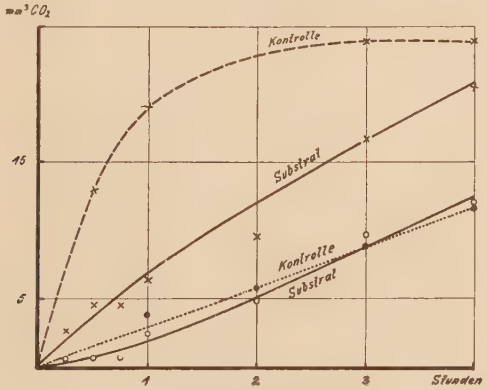


Abb. 6. Versuch 24.

Der Leerwert der Substratkontrolle übersteigt den Wert der Spaltungsgefäße. Dies ist wieder auf eine CO_2-Retention der Fermentlösung zurückzuführen, jedenfalls ist aber keine Spaltung nachweisbar. Die CO_2-Bildung der Substratlösung kann auf einer schwachen hydrolytischen Spaltung beruhen, die eben doch bei der wenn auch schwachen Alkaleszenz bei der Temperatur von 37,5° C. bereits eintritt. Sie kann aber auch auf Atmungsvorgängen irgendwelcher Bakterien beruhen.

25. Versuch.

Wiederholung des gleichen Versuches mit frisch bereiteter Fermentlösung. Durchleiten eines CO_2-N_2-Gemisches statt des CO_2-O_2-Gemisches.

Tabelle XVI.

Zeit	II.			III.			IV.			V.		
	0,5 Substrat 0,5 Ferment 0,5 Ringer			0,5 Substrat 0,5 Ferment 0,5 Ringer			0,5 Substrat 0,5 Glycerin 0,5 Ringer			0,5 Bikarbonat 0,5 Ferment 0,5 Ringer		
10′	0,7	4,4	4,4	0,4	2,8	2,8	0,1	0,6	0,6	0,2	1,2	1,2
15	—	—	4,4	0,2	1,2	4,0	0,2	1,2	1,8	0,3	1,8	3,0
30	0,2	1,3	5,7	0,1	0,6	4,6	0,3	1,8	3,6	0,3	1,8	4,8
60	0,2	1,3	7,0	0,1	0,6	5,2	0,6	3,7	7,3	1,2	7,2	12,0

Das gleiche Ergebnis: Keine Spaltung.

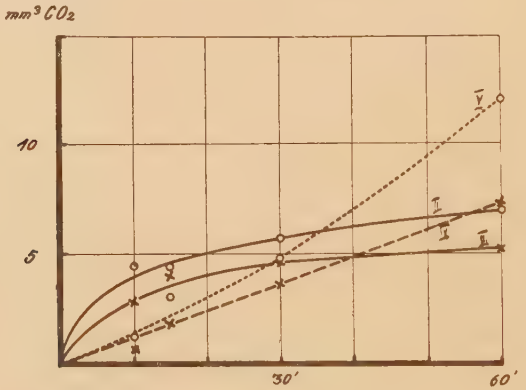


Abb. 7. Versuch 25.

Die CO_2-Entwicklung bei der Fermentkontrolle führte zu der Idee, daß bei der jedenfalls tryptischen Spaltung der begleitenden Eiweißstoffe irgendwelche Säuren frei würden, die CO_2 aus der Ringerlösung austreiben. Es lag daher nahe, willkürlich Eiweißstoffe zuzufügen.

26. Versuch.

Spaltungsversuch einer Caseinlösung. Ferner einer 1% igen Peptonlösung.

0,1 g Casein werden in 100 ccm $1/_{100}$ iger Sodalösung gelöst, dann Kohlensäure bis zur Sättigung durchgeleitet und die überschüssige durch Schütteln wieder entfernt.

Anwendung von Darmschleimhautextrakt.

Tabelle XVII.

Zeit	I.			II.			III.			IV.			V.		
	0,5 Casein 0,5 Ferment 0,5 Ringer			0,5 Pepton 0,5 Ferment 0,5 Ringer			0,5 Casein 0,5 Glycerin 0,5 Ringer			0,5 Pepton 0,5 Glycerin 0,5 Ringer			0,5 Wasser 0,5 Ferment 0,5 Ringer		
10′	0,7	4,3	4,3	0,2	1,2	1,2	0,3	1,7	1,7	0,1	0,6	0,6	0,9	5,7	5,7
15	0,2	1,2	5,5	—	—	1,2	0,1	0,6	2,3	—	—	0,6	0,3	1,9	7,6
20	—	—	5,5	-0,1	-0,6	0,6	0,1	0,6	2,9	—	—	0,6	—	—	7,6
30	0,2	1,2	6,7	—	—	0,6	0,2	1,1	4,0	0,5	3,2	3,8	0,1	0 6	8,2
1h	0,5	3,0	9,7	0,2	1,2	1,8	0,7	4,0	8 0	—	—	3,8	0 4	2 5	10,7
2	0,2	1,2	10,9	-0,1	-0,6	1,2	—	—	8,0	—	—	3,8	0,2	1,3	12 0
3	—	—	10,9	—	—	1,2	—	—	8,0	—	—	3,8	—	—	12,0

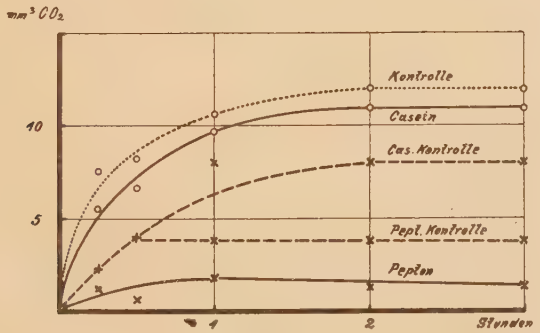


Abb. 8. Versuch 26.

Daß der Fermentwert wieder größer ist als in den Spaltungsgefäßen, beruht wieder auf Retentionsvorgängen. Bei der 1%igen Peptonlösung ist die Retention besonders groß. Spaltung ist keine bemerkbar. Die kleinen Werte der Fermentlösungen sind doch auch vielleicht auf Vorgänge bakterieller Natur zurückzuführen.

27. Versuch.

Verwendung einer mit Ringerlösung abgestumpften, 10%igen Peptonlösung und frisch hergestellten Glycerinextraktes aus Darmschleimhaut vom Schwein.

Tabelle XVIII.

Zeit	I.			II.			III.		
	0 5 Pepton 0 5 Ferment 0,5 Ringer			0,5 Pepton 0,5 Glycerin 0,5 Ringer			0,5 Wasser 0,5 Ferment 0,5 Ringer		
10′	—	—	—	0,5	3,2	3,2	0,3	1,8	1,8
15	—	—	—	0,4	2,9	6,1	0,3	1,8	3,6
20	0,2	1,1	1,1	0,1	0,6	7,7	0,1	0,6	4,2
25	0,2	1,1	2,2	0,1	0,6	8,3	—	—	4,2
30	—	—	2,2	0,3	1,9	10,2	0,1	0,6	4,8
1h	—	—	2,2	0,2	1,3	11,5	0,2	1,2	6 0
2	—	—	2,2	0,3	1,9	13,4	—	—	6,0
3	0,2	1,1	3,3	0,2	1,3	14,7	0,6	3,7	9,7
4	—	—	3,3	—	—	14,7	—	—	9,7

Der Leerwert der frischen Fermentlösung ist geringer. Dies spricht für eine Erklärung auf bakterieller Grundlage.

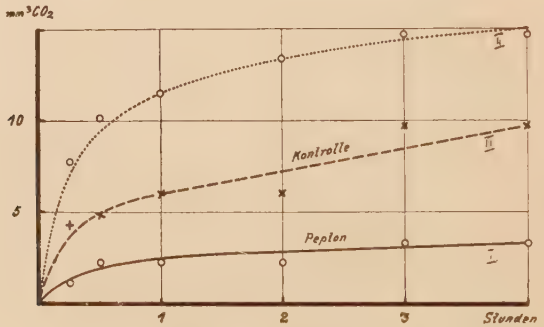


Abb. 9. Versuch 27.

Spaltung ist auch diesmal keine nachzuweisen, da die Summe der beiden Leerwerte etwa dem Wert des Spaltungsgefäßes gleichkommt.

LITERATURZUSAMMENSTELLUNG

Theoretischer Teil:

1. Warburg und Minami, Bioch. Ztschft. Bd. 142, S. 317, 334. 1923. Klin. Wschft. II, Nr. 17, 1923.
2. Rona u. Lasnitzki, Bioch. Ztschft. Bd. 152, S. 504.
3. Sörrensen, Bioch. Ztschft. Bd. 7, S. 45. 1908.
4. Willstätter u. Waldschmidt-Leitz, Ztschft. f. Physiol. Chemie. Bd. 132, S. 181. 1924. Bd. 151, S. 42. 1926.
5. Van Slyke, Journ. of biol. chem. Bd. 9, S. 185. 1911. Ber. d. d. chem. Ges. Bd. 43, S. 3170.
6. Northrop, Journ. of gen. physiol. Bd. 4, S. 227.
7. Rona u. Kleinmann, Bioch. Ztschft. Bd. 169, S. 320. 1926.
8. Winkelblech und Lundén, Ztschft. f. physik. Chem. Bd. 36, S. 566,
9. Euler, Hofmeisters Beiträge. Bd. 7, S. 1. 1906.
10. Landoldt-Börnstein, Physikochemische Tabellen.
11. Fischer u. König, Ber. d. d. chem. Ges. Bd. 37, S. 4594.
12. Fischer u. Abderhalden, Ztschft. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 52. 1905.
13. Waldschmidt-Leitz u. Schäffner, Ztschft. f. physiol. Chem. Bd. 151, S. 31.
14. Derby, Bioch. Ztschft. Bd. 81, S. 133.
15. Warburg, Bioch. Ztschft. Bd. 164, S. 481. 1925.
16. Waldschmidt-Leitz und Harteneck, Ztschft. f. physiol. Chem. Bd. 149, S. 208. 1925.
17. Rona und Arnheim, Bioch. Ztschft. Bd. 57, S. 84. 1913.

Experimenteller Teil:

18. Kekulé, Liebigs Analen splm. Bd. 2, S. 386.
19. Fischer, Ber. d. d. chem. Ges. Bd. 34, S. 433. 1901,
20. Waldschmidt-Leitz und Schäffner, Ztschft. f. physiol. Chem. Bd. 151, S. 44. 1925.
21. Waldschmidt-Leitz und Harteneck, Ztschft. f. physiol. Chem. Bd. 147, S. 296. 1925.
22. Euler, Ztschft. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 216. 1907.
23. Fischer, Ber. d. d. chem. Ges. Bd. 38, S. 605. 1905,
24. Fischer und Brunner, Ann d. Chem. und Pharm. Bd. 340, S. 142, 1905.
25. Waldschmidt-Leitz und Schäffner, Ztschft. f. physiol. Chem. Bd. 151, S. 37. 1925.
26. Rona und Nicolai, Biochem. Ztschft. Bd. 172, S. 212. 1926.

Lebenslauf.

Ich wurde am 3. Februar 1901 zu Wien geboren als dritter Sohn des damaligen Obering. Viktor Engelhardt, jetzigen Direktors der Siemens & Halske A.-G. und Professors der technischen Hochschule zu Charlottenburg, und seiner Frau Karoline, geb. Köstlin.

Mit 5 Jahren kam ich nach Berlin, wo ich von Ostern 1907 bis Ostern 1920 die Siemens-Ober-Realschule zu Charlottenburg besuchte, welche ich mit dem Zeugnis der Reife verließ. Im Jahre 1912 erwarb mein Vater mit seiner Familie die preußische Staatsangehörigkeit. Ich studierte von 1920—1925 Medizin an der Friedrich-Wilhelm-Universität zu Berlin, legte im Sommer 1922 die ärztliche Vorprüfung, im Sommer 1925 das ärztliche Staatsexamen ab. Seit Oktober 1925 war ich als Medizinalpraktikant 4 Monaten in der III. med. Klinik (Dir. Geh. Rat Goldscheider) und 4 Monate auf der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Charité tätig, in welcher Zeit ich meine Dissertationsarbeit: „Ueber die Möglichkeiten einer gasanalytischen Methode zur Untersuchung der fermentativen Eiweißspaltung" fertigstellte. Augenblicklich arbeite ich an der bakteriologischen Untersuchungsstation des hygienischen Institutes, wo ich bis zum Ablauf des praktischen Jahres verbleiben werde.